

氏 名	しょう あつ こ 庄 敦 子
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 記 番 号	甲第538号
学位授与年月日	平成18年 3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学 位 論 文 題 目	Establishment of experimental glioma models at the intrinsic brainstem region of the rats (ラット脳幹グリオーマモデルの作製)
学位論文審査委員	(主査) 大 浜 栄 作 (副査) 大 野 耕 策 渡 辺 高 志

## 学 位 論 文 の 内 容 の 要 旨

脳幹グリオーマは主に小児に発生する予後不良の髄内腫瘍である。臨床的には中脳、延髄外側に発生し、腫瘍境界が比較的明瞭なタイプと、橋に発生してび慢性に増殖し、極めて予後不良なタイプがある。脳幹という部位の特性のため手術摘出には限界があり、化学療法などの補助療法が治療戦略として重要である。このような臨床的背景のもと、脳幹グリオーマモデルの作製を試みた結果、ラット C6 グリオーマ細胞を定位の手技によって移植することにより中脳、橋それぞれに限局し、治療モデルともなり得る脳幹グリオーマモデルの作製に成功した。

## 方 法

体重200～250gのウィスターラット31匹を使用した。ラット脳マップを参考に、中脳水道周囲灰白質、橋被蓋、大脳皮質にC6グリオーマ細胞を注入するための座標軸を決定した。動物実験用定位脳手術装置を使用し、直径0.6mmのステンレスパイプのガイドカニューレとそれより1mm長い直径0.3mmの注入用カニューレを用いて、培養したC6グリオーマ細胞を注入移植した。ガイドカニューレ内に、注入用カニューレを挿入したままレジンと0.2mmのステンレスワイヤーで固定した。3日後、 $5 \times 10^4$ 個の腫瘍細胞を含むC6グリオーマ細胞液1 $\mu$ lを、ハミルトンシリンジとポリエチレンチューブで接続したカニューレを用いて1分間かけて注入した。注入用カテーテルを1分間留置し、細胞液の逆流を防止した。その後注入用カニューレを抜き、ガイドカニューレを切断した。移植後、3, 7, 10日目に脳を取り出し、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定した後、パラフィン包埋した。パラフィン切片を用いて腫瘍増殖能、腫瘍形態を組織学的に検討するとともに、各種増殖因子などの発現を免疫組織化学的に検索した。

## 結 果

31 匹中 3 匹は麻酔中に死亡し、2 匹は C6 グリオーマ細胞液注入後 5 日以内に不明の原因で死亡したので、腫瘍生着率は 92.9%(26/28 匹)であった。中脳、橋、大脳皮質に移植された C6 グリオーマ細胞は設定した目標部位に、髄液播種を起こすことなく生着し、日数の経過とともに増大した。それぞれ設定した一定の座標軸を用いて注入することにより再現性を示した。H&E 染色による組織像はどの部位でも同様で、壊死は見られず、双極性に突起を伸ばした細胞や円形の細胞が集簇したグリオーマの特徴を示した。挿入したカニューレ周囲の脳組織に出血や虚血性変化は見られず、移植侵入路にも腫瘍形成は認められなかった。中脳、橋グリオーマモデルの腫瘍増殖能はともに MIB-1 labeling index は 30%程度であり、大脳皮質移植グリオーマモデルとの差はみられなかった。免疫組織化学の結果は、MMP-2、MMP-9、EGFR は陽性、GFAP、VEGF、PDGFR、bFGF は陰性であった。

## 考 察

これまで報告されている脳幹腫瘍モデルは作製過程で髄液播種を生じたものが多い。本研究ではカニューレの留置方法と腫瘍細胞の注入方法を工夫することにより、髄液播種を伴うことなく、限局性の脳幹グリオーマモデルを確実に作製することが出来た。さらに、定位脳手術装置の座標軸設定を変えることにより、中脳グリオーマと橋グリオーマを別々に作製することにも成功した。両脳幹グリオーマは臨床経過が異なるため、その要因追求のモデルとして使用可能であり、また、本腫瘍モデルは、カニューレを腫瘍内に留置した状態であるため、カニューレによる薬剤の局所投与が可能であり、治療実験にも使用可能である。さらに、本脳幹グリオーマモデルは、長期間カニューレを留置することが可能であるため、血液脳関門を通過し得ない高分子薬剤の投与実験や、近年注目されている convection-enhanced delivery を利用した薬剤注入実験にも応用可能である。

## 結 論

動物用定位脳手術装置とラット脳マップ座標軸を用いて、ラットに再現性のある脳幹グリオーマモデルの作製に成功した。この方法で作製された脳幹グリオーマモデルは、内筒カニューレ付きモデルであるため、各種薬剤による治療実験にも応用可能である。

## 審 査 結 果 の 要 旨

本研究はウィスターラットを使用し、カニューレの留置方法と腫瘍細胞の注入方法を工夫することにより、髄液播種を伴うことなく限局性の脳幹グリオーマモデルを確実に作製することに成功したものである。さらに、本脳幹グリオーマモデルは長期間カニューレを留置することが可能であるため、血液脳関門を通過し得ない高分子薬剤の投与実験や convection-enhanced delivery を利用した薬剤注入実験にも応用可能である。本論文は、再現性があり、かつ、各種薬剤による

治療実験にも応用可能な脳幹グリオーマモデルの作製に成功したものであり、明らかに学術の水準を高めたものと認める。